

KATARZYNA WIECZOREK, HALSZKA PONAMARCZUK, MARCIN POPIELARSKI,
KATARZYNA SOBIERAJSKA

*Zakład Biofizyki Molekularnej i Medycznej
Wydział Nauk o Zdrowiu
Uniwersytet Medyczny w Łodzi
Mazowiecka 6/8, 92-215 Łódź
e-mail: katarzyna.sobierajska@umed.lodz.pl*

ZASTOSOWANIE MIKROSKOPII KONFOKALNEJ W DIAGNOSTYCE CHOROÓB NOWOTWOROWYCH

WPROWADZENIE

Poprawa warunków bytowych oraz rozwój powszechnej opieki medycznej decydująco wpłynęły na wzrost średniej długości życia, stwarzając jednakże większe prawdopodobieństwo nagromadzenia mutacji onkogennych w komórkach, a także zmian prowadzących do procesu nowotworzenia. Zaobserwowano, że częstotliwość występowania nowotworów jest w istotny sposób powiązana z obecnością szkodliwych, kancerogennych związków w otoczeniu i codziennej diecie (NEWBERNE i CONNER 1986). Z tych względów choroby o podłożu onkologicznym stały się globalnym problemem dotyczącym wszystkich rozwiniętych społeczeństw. Powszechność występowania, stopień zróżnicowania oraz skala problemu wymuszają na środowisku naukowym konstruowanie coraz doskonalszych metod diagnostycznych, umożliwiających dokładną, szybką i możliwie najtańszą weryfikację tego rodzaju zmian w tkankach pacjenta. To głównie od precyzyjności wstępnej diagnostyki medycznej zależy szybkość rozpoczęcia terapii i możliwość uniknięcia etapu przerzutowania guza, który znacząco obniża szanse pacjenta na wyzdrowienie. Współczesne metody diagnostyczne guzów nowotworowych dzielą się na 3 główne typy: diagnostykę laboratoryjną (opartą na biochemicznych testach aktywności specyficznych enzymów i markerów nowotworowych), patomorfologiczną (histopatologiczną oceną wycinków tkankowych lub cytolo-

giczna ocena rozmazów) i obrazową (w tym RTG, USG, rezonans magnetyczny czy tomografia komputerowa) (SZCZEBŁOWSKA 2007, MOCARSKA i współaut. 2012, VERMA 2012).

Rozwój mikroskopii konfokalnej, umożliwiający analizę oddziaływania pojedynczych molekuł w połączeniu z najnowszej generacji kamerami CCD, pozwala na tworzenie narzędzi o ogromnym potencjale diagnostycznym (ST. CROIX i współaut. 2005). Technika mikroskopii konfokalnej z uwagi na wysoką rozdzielczość otrzymywanych obrazów, bezinwazyjność, czyli możliwość obserwacji tkanek pacjenta w układach endoskopowych, a także na dużą szybkość uzyskiwania wyników przeprowadzonych badań już niedługo może okazać się nieoceniona w diagnostyce chorób nowotworowych. Stanowi tym samym poważną konkurencję dla tradycyjnych badań histopatologicznych, wymagających pobrania wycinków zmienionej tkanki, bardzo precyzyjnego i czasochłonnego przygotowania oraz analizy uzyskanych preparatów. W niniejszej pracy przedstawimy sposoby wykorzystania mikroskopii konfokalnej już stosowane w badaniach klinicznych diagnostyki nowotworowej. Przyjrzymy się także tym będącym na etapie wstępnych badań u ludzi, jak i analizom mającym na celu rozwój metod obrazowania opartego o mikroskopię konfokalną będących dopiero w fazie badań na modelach zwierzęcych.

Za nowotwory uważa się zmiany, w których komórki podlegają niekontrolowanemu podziałom i nie różnicują się w typowe dla nich tkanki. Do rozwoju choroby nowotworowej niezbędne jest nabycie przez komórkę następujących właściwości (HANAHAHAN i WEINBERG 2000): (i) nieograniczonej zdolności proliferacji, (ii) niewrażliwości na egzogenne czynniki antywzrostowe, (iii) omijania apoptozy poprzez utratę wrażliwości na czynniki ją indukujące, (iv) stymulowania procesu angiogenezy oraz (v) zdolności inwazji sąsiednich tkanek i (vi) tworzenia przerzutów (metastaza).

Obecnie znanych jest bardzo wiele rodzajów i typów nowotworów, odmiennych pod względem stopnia zróżnicowania komórek i morfologii. Choć współczesna medycyna dysponuje różnorodnymi metodami diagnostycznymi, m.in. testami biochemicznymi opierającymi się na wykryciu specyficznych dla danego typu nowotworu białek, często właśnie wczesna diagnostyka okazuje się niedokładna i nie dość czuła dla ujawnienia groźnych dla organizmu zmian onkologicznych. Wbrew powszechnemu myśleniu, guzy nowotworowe nie muszą być jednorodnym tworem, wyraźnie odcinającym się od tkanek gospodarza. Wręcz przeciwnie, udowodniono, że guzy lite zawierają różnorodne komponenty pozanowotworowe, takie jak białka macierzy zewnątrzkomórkowej (np. kolagen i fibronektyna) oraz inne komórki, m.in. fibroblasty, limfocyty, komórki dendrytyczne czy makrofagi i dynamicznie oddziałują ze swoim otoczeniem (BOUVET i współaut.

2006, BOISSONNAS i współaut. 2007). Do śledzenia tak dyskretnych zmian w żywym organizmie konieczne jest możliwie jak najdokładniejsze uwidocznienie poszczególnych typów komórek. Jednym z kierunków badań mających na celu poprawę jakości wczesnej diagnostyki onkologicznej jest konstruowanie modeli myszy z wykorzystaniem całego spektrum genów reporterowych, w tym także fluorescencyjnych, jak np. EGFP czy ECFP, eksprymowanych pod promotorami specyficznymi dla danych linii komórek. Technika ta dowiodła m.in., że komórki mieloidalne są najliczniejszą klasą komórek infiltrujących guzy nowotworowe, a ich zdolność migracji jest znacząco wyższa w rejonach granicznych guza i stromy, niezależnie od etapu zaawansowania choroby (EGEBLAD i współaut. 2008). Wykorzystując technikę mikroskopii konfokalnej zobrazowano migrację komórek mieloidalnych po iniekcji roztworu fluorescencyjnego dekstranu. Analizując trajektorie ruchu komórek wykazano, że subpopulacja makrofagów nieakumulujących związku dekstranu wykazuje podwyższoną ruchliwość na granicy tkanki nowotworowej. Prawdopodobnym wyjaśnieniem podwyższonej mobilności na obrzeżach guza może być ściśle upakowana struktura tkanki nowotworowej, uniemożliwiająca głębszą infiltrację komórek (LEINSTER i współaut. 2012). Być może podobne obserwacje znajdą w przyszłości zastosowanie w wizualizacji niszy podejrzanego nowotworu, dopełniając diagnostykę nowotworową.

ODBICIOWA MIKROSKOPIA KONFOKALNA *IN VIVO*

Obrazowanie zmian nowotworowych w czasie rzeczywistym *in vivo* stanowi obecnie jedno z największych wyzwań i nadziei współczesnej onkologii. W prowadzonych wcześniej badaniach opartych na technice mikroskopii konfokalnej w diagnostyce nowotworowej analizowano skrawki tkanek pobieranych od pacjentów, barwionych toksycznymi dla zdrowia markerami takimi jak błękit metylenowy czy toluidynowy (AL-ARASHI i współaut. 2007). Refleksyjna mikroskopia konfokalna *in vivo* (ang. *in vivo* reflectance confocal microscopy, RCM), to nowoczesna, nieinwazyjna metoda diagnostyczna, pozwalająca na wizualizację tkanek z dokładnością porównywalną do osiąganą metodami histologicznymi (GONZÁLEZ i GILA-

BERTE-CALZADA 2008) w czasie rzeczywistym, znajdująca coraz szersze zastosowanie w diagnostyce nowotworów.

Złośliwe nowotwory skóry należą do grupy najczęściej notowanych nowotworów u ludzi rasy białej. Długa ekspozycja na słońce, np. podczas egzotycznych urlopów i dominująca moda na opaloną skórę są czynnikami decydującymi o rozpowszechnieniu tego typu nowotworów. Zjawisko to nasiliło się szczególnie w przeciągu ostatnich dekad (PARK i współaut. 2012)

Badania z wykorzystaniem RCM okazały się być szczególnie przydatne w diagnostyce nowotworów skóry (BRANZAN i współaut. 2007), w tym we wczesnej diagnostyce czerniaka oraz niemelanocytowych nowotworów

skóry (ULRICH i współaut. 2007, HOFMANN-WELLENHOF i współaut. 2009). Znalazła ona także zastosowanie w monitorowaniu nieinwazyjnych metod leczenia stanów przednowotworowych oraz nowotworów skóry (GONZÁLEZ 2008, AHLGRIMM-SIESS i współaut. 2009). Ta nowatorska technika może stanowić przełom w badaniach zmian skórnych, stwarzając możliwość natychmiastowej i nieinwazyjnej diagnozy. Rutynowe rozpoznawanie schorzeń opiera się zazwyczaj na ocenie klinicznej połączonej z analizą histopatologiczną wycinka tkanki. Zastosowanie badania mikroskopowego *in vivo*, jako metody nieinwazyjnej, przez co nie powodującej skutków ubocznych w postaci szpecących blizn czy stanów zapalnych w miejscu biopsji, stanowiłoby tu pozytywną alternatywę. Wykazano, że wysoka rozdzielczość uzyskanych obrazów mikroskopowych pozwala na diagnostykę zmian nowotworowych z dokładnością porównywalną do analizy histopatologicznej, a czas uzyskania diagnozy staje się znacząco krótszy (LONGO i współaut. 2012). Ocena wysokorozdzielczych obrazów mikroskopowych ma szczególne znaczenie przy niewielkich zmianach skórnych, trudnych do rozpoznania lub też w przypadku pacjentów przyjmujących leki immunosupresyjne.

W przekrojach optycznych wykonanych metodą RCM można zaobserwować charakterystyczny obraz poszczególnych warstw skóry zdrowej i zmienionej nowotworowo (BRANZAN i współaut. 2007, GONZÁLEZ i GILABERTE-CALZADA 2008, HOFMANN-WELLENHOF i współaut. 2009). Szybki rozwój badań nad wykorzystaniem tej metody do oceny zmienionych onkologicznie tkanek skórnych pozwolił na stworzenie już w 2004 r. kryteriów rozpoznania raka podstawnokomórkowego (NORI i współaut. 2004). Stwierdzono, że obecność czterech z pięciu opisanych przez autorów kryteriów umożliwia rozpoznanie

nowotworu z 96% swoistością oraz 83% czułością, natomiast obecność wszystkich pięciu cech prowadzi do zwiększenia swoistości do 100%, przy 49% czułości (NORI i współaut. 2004). Kolejnym nowotworem skóry, dla którego na podstawie licznych badań udało się określić kryteria rozpoznania metodą refleksyjnej mikroskopii konfokalnej *in vivo* jest czerniak *in situ*. Przeprowadzone w 2009 r. analizy porównujące swoistość i czułości RCM i dermatoskopii w ocenie czerniaka złośliwego udowodniły, że pierwsza z nich wykazuje znacząco wyższą swoistość (68% do 32%). Czułość obu badanych metod była bardzo wysoka, a różnice pomiędzy nimi nie przekraczały 3% (91% w stosunku do 88%). Prawidłowe określenie granic cięcia chirurgicznego pełni kluczową rolę w zapobieganiu groźnym dla życia przerzutom. Wśród nowotworów skóry wykazano przydatność metody RCM w określaniu linii cięcia w przypadku usuwania raka podstawnokomórkowego metodą chirurgii Mohsa (CHUNG i współaut. 2004, GAREAU i współaut. 2008). Ponadto wykazano, że RCM pozwala na obserwacje zmian w trakcie leczenia raka podstawnokomórkowego, bez konieczności wykonywania długotrwałych badań histopatologicznych.

Metoda RCM posiada potencjał do usprawnienia diagnostyki także innych nowotworów związanych ze zmianami w obrębie śródbłonna. Wstępne wyniki z badań klinicznych pokazują, że metoda RCM, w połączeniu z tradycyjnym badaniem kolposkopem, może stać się użytecznym narzędziem we wczesnej diagnostyce raka szyjki macicy oraz w ocenie zmian przedrakowych w obrębie szyjki macicy, jaką stanowi bardzo trudna w samej ocenie kolposkopowej śródbłonkowa neoplazja szyjki macicy (TAN i współaut. 2007).

LASEROWA ENDOMIKROSKOPIA KONFOKALNA

Endoskopowa ocena stanu błony śluzowej układu pokarmowego jest stosowana w diagnostyce gastrologicznej już od ponad 60 lat. Ten typ badania zwyczajowo uzupełniany jest szczegółową analizą histopatologiczną, dopiero po wykonaniu której zapada decyzja o wyborze terapii.

Laserowa endomikroskopia konfokalna (ang. confocal laser endomicroscopy, CLE) jest nowoczesną techniką łączącą w sobie

zalety wysokorozdzielczego obrazowania konfokalnego i standardowej endoskopii. Umożliwia ona praktycznie natychmiastową diagnostykę zmian występujących nawet do 250 μm pod powierzchnią błony śluzowej, z dokładnością zbliżoną do badania histopatologicznego. Obrazowanie tą techniką, podobnie jak w przypadku tradycyjnej endoskopii, wymaga zastosowania barwników fluorescencyjnych stosowanych dożylnie (np. 10% roz-

twór fluoresceiny) lub też miejscowo na powierzchni błony (np. akryflawina). Fluoresceina rozpraszana przez system drobnych naczyń włosowatych w rejonie błony śluzowej, po wzbudzeniu laserem emituje świecenie umożliwiające robienie zdjęć endomikroskopowych. Nowoczesne endomikroskopy umożliwiają przeprowadzanie zarówno panendoskopii (badania przełyku), jak i kolonoskopii, dzięki czemu diagnostyka obejmuje praktycznie całe spectrum przewodu pokarmowego człowieka (GOETZ i KIESSLICH 2008). Zastosowanie CLE umożliwia śledzenie zmian w złożonej strukturze różnorodnych nabłonków budujących przełyk i jelita. Technika ta stosowana jest z powodzeniem w diagnostyce przełyku Barretta, chorobie polegającej na zastąpieniu prawidłowego dla przełyku nabłonka wielowarstwowego płaskiego nabłonkiem walcowatym charakterystycznym dla żołądka. Porównanie uzyskanych obrazów konfokalnych i histopatologicznych wykazało aż około 98% czułość techniki z wykorzystaniem laserowej endomikroskopii konfokalnej (KIESSLICH i współaut. 2006). W praktyce, dla pacjentów może oznaczać to zmniejszenie liczby biopsji koniecznych do potwierdzenia diagnozy lub też zupełny brak konieczności pobierania wycinka tkanki (MILEWSKI i współaut. 2011). Innymi schorzeniami układu pokarmowego, wykrywanymi techniką CLE, badania których prowadzi się u ludzi są m.in.: nienadżerkowa choroba refluksowa, wczesny rak płaskonabłonkowy przełyku, rak żołądka,

choroba trzewna (celiakia) czy polipowatość i rak jelita grubego (MILEWSKI i współaut. 2011, USSUI i WALLACE 2012).

Szczegółowa diagnostyka ostatniej z wymienionych chorób nabiera obecnie wyjątkowego znaczenia. Rak jelita grubego wciąż stanowi jedną z głównych przyczyn zgonów w społeczeństwach rozwiniętych, a wczesne rozpoznanie znacząco podwyższa szanse na wyleczenie (BRETTHAUER i KALAGER 2013). Na podstawie licznych badań w grupach klinicznych, porównujących różne stadia choroby w obrazach konfokalnych i histopatologicznych, oszacowano, że zastosowanie obu tych metod diagnostycznych daje około 99% szansę na trafną ocenę występowania zmian nowotworowych (USSUI i WALLACE 2012).

Ciekawym zagadnieniem jest wykrywanie infekcji *Helicobacter pylori* za pomocą CLE. Bakteria ta, powszechnie występująca w śluzie błony żołądka, u ponad 50% populacji może prowadzić do powstawania poważnych nadżerek, choroby wrzodowej, a nawet zmian nowotworowych. Najbardziej popularny typ diagnostyki, metoda biochemiczna polegająca na wykrywaniu specyficznych przeciwciał klasy IgG wytworzonym przeciwko drobnoustrojowi, nie zawsze pozwala na wiarygodną ocenę. Zastosowanie endomikroskopii CLE w połączeniu z barwieniem akryflawiną pozwala precyzyjnie zidentyfikować występowanie skupisk bakteryjnych oraz zmniejszyć odsetek wyników fałszywie ujemnych (KIESSLICH i współaut. 2005).

BADANIA ŚRÓDOPERACYJNE OPARTE O MIKROSKOPIĘ KONFOKALNĄ

Nowotwory mózgu, z uwagi na swoje specyficzne ułożenie, są jednymi z chorób o najgorszych rokowaniach dla pacjenta. Bariera ochronna krew-mózg poważnie ogranicza skuteczność stosowanych chemioterapii powodując, że często jedynym leczeniem z wyboru pozostaje resekcja guza (JAKOLA i współaut. 2012). Wykazano, że kluczowe znaczenie dla dalszej terapii ma dokładne usunięcie zmienionej nowotworowo tkanki. Pozostawienie nawet niewielkich fragmentów guza może prowadzić do szybkiego nawrotu choroby i zgonu pacjenta, z kolei usunięcie zdrowej tkanki może skutkować ciężkimi powikłaniami neurologicznymi (BEKELIS i współaut. 2013). Obecnie „złotym standardem” służącym do oceny stanu tkanek jest analiza histopatologiczna biopsji pobieranych od pacjenta. Metoda ta pozwala określić z wysoką

dokładnością postępowanie choroby nowotworowej i analizę obserwowanych tkanek. Niestety wykonanie badania wiąże się z koniecznością pobrania wycinka tkanki, co w przypadku guzów mózgu może skutkować poważnymi konsekwencjami (BEKELIS i współaut. 2013). Zastosowanie mikroskopii konfokalnej daje nadzieję na nieinwazyjną, szybką i dokładną analizę tkanek nowotworowych mózgu już w sali operacyjnej. Naukowcy z Massachusetts (WIRTH i współaut. 2012) w wynikach swoich badań zaprezentowali możliwość identyfikacji różnorodnych podtypów nowotworów mózgu, a w tym glejaków typu LGG i HGG, oponiaków czy guzów przerzutowujących, w oparciu o analizę zdjęć fluorescencyjnych. Obrazy uzyskane w oparciu o mikroskopię konfokalną barwione błękitem metylenowym pozwalały zaobserwować róż-

norodność kształtów i typów komórek w tkance nerwowej. Analiza uzyskanych obrazów wraz z określeniem współczynnika refrakcji pozwoliły na określenie różnorodnych procesów zachodzących w komórce w tym zmian struktury i ziarnistości, niewidocznych w tradycyjnym badaniu histopatologicznym. Wykazano, że klasyfikacja ludzkich guzów nowotworowych na podstawie tych dwóch wartości jest praktycznie identyczna z tą, opartą wyłącznie na analizie histopatologicznej (WIRTH i współaut. 2012). Możliwe więc, że mikroskopia konfokalna już niedługo będzie stanowić narzędzie pomocne w ocenie klinicznej zmian nowotworowych mózgu.

Klasyczna diagnostyka nowotworów piersi związana jest z inwazyjną metodą biopsji gruboigłowej. Pionierskie badania oparte o analizę konfokalną dowiodły, że metoda ta może być przydatna w diagnostyce nowotworów piersi. Autorzy dowodzą, że na pod-

stawie uzyskanych obrazów możliwe staje się rozróżnienie tkanek zmienionych nowotworowo od zdrowych bądź jedynie zmienionych zapalnie, tak samo skutecznie jak przy pomocy metod histologicznych. Niewątpliwymi zaletami metod opartych o techniki mikroskopii konfokalnej jest zdecydowanie krótszy czas oceny badanego preparatu oraz konieczność pobrania znacząco mniejszej ilości materiału (SCHIFFHAUER i współaut. 2009). Problemem pozostaje fakt, że zastosowana przez autorów metoda przygotowania preparatów uniemożliwia oceną obecności markerów nowotworowych istotnych w wyborze sposobu leczenia chemioterapią uzupełniającą. Jednakże przedstawione badania po dopracowaniu dają nadzieję na stworzenie szybszej i mniej ingerującej w organizm pacjentek metody diagnostyki nowotworów piersi.

BADANIA NA MODELACH ZWIERZĘCYCH

Wykorzystywanie mikroskopii konfokalnej w diagnostyce nowotworowej zyskuje na znaczeniu szczególnie w połączeniu z zastosowaniem różnorodnych nanocząsteczek, jak np. dendrymery czy aptamery, dzięki którym wyznakowanie specyficznych receptorów czy białek nowotworowych staje się jeszcze precyzyjniejsze. Jedną z grup takich cząsteczek stanowią nanokrystaliczne kropki kwantowe (ang. Quantum Dots, QDs), wykazujące unikalne właściwości fizyczne: m.in. niezwykłą jasność emitowanego światła, doskonałą fotostabilność, szerokie spektrum wzbudzenia i bardzo wąskie spektrum emisji. Skoniugowanie kropek kwantowych z przeciwciałami specyficznymi dla danych markerów nowotworowych wykorzystywano już w licznych eksperymentach obrazowania komórek w tym: raka piersi, prostaty czy glejaków (WU i współaut. 2003, GAO i współaut. 2004, CAJ i współaut. 2006). Niestety dotychczasowe badania prowadzone były w większości na modelu linii komórkowych *in vitro*, gdzie warunki eksperymentalne znacząco różnią się od występujących w ludzkim organizmie. Ostatnio podejmowane są jednak próby oceny skuteczności kropek kwantowych w detekcji komórek nowotworowych w warunkach maksymalnie zbliżonych do *in vivo*. W pracy KIM i współaut. (2012) wykorzystano model tzw. kokultury, w której zdrowe komórki melanocytów występują razem

z komórkami nowotworowymi czerniaka. W porównaniu z konwencjonalnymi obrazami immunofluorescencyjnymi, metoda z wykorzystaniem przeciwciał skoniugowanych z kropkami kwantowymi wykazywała wysoką specyficzność wobec komórek zmienionych nowotworowo i generowała znikome tło w stosunku do metody tradycyjnej (KIM i współaut. 2012). Tak wysoka specyficzność detekcji jest szczególnie pożądana w przypadku nowotworów trudnych w ocenie cytologicznej, jaką jest m.in. przerzutująca forma czerniaka.

Badania (WANG i współaut. 2012) wykorzystujące dwuosiową mikroskopię konfokalną (ang. dual-axis confocal microscopy, DAC) prowadzono na modelu rdzeniaka zarodkowego, który należy do grupy pierwotnych i wysoce złośliwych guzów ośrodkowego układu nerwowego, rozwijających się najczęściej w mózdzku. W swojej pracy badacze podkreślili istotne znaczenie diagnostyczne tworzonych wysokorozdzielczych obrazów, dzięki czemu możliwość usuwania podczas zabiegów jedynie tkanki zmienionej nowotworowo będzie mogła zostać zwiększona do maksimum. Jakość otrzymanych obrazów została osiągnięta dzięki zastosowaniu specyficznego barwienia nowotworu rdzeniaka zarodkowego za pomocą przeciwciała monoklonalnego skierowanego przeciwko receptorowi czynnika wzrostu

śródbłonka naczyniowego (ang. vascular endothelial growth factor receptor 1, VEGFR-1) skoniugowanego z fluoroforem AF647 (WANG i współaut. 2012). Receptor ten podlega nadprodukcji na powierzchni komórek nowotworowych rdzenia zarodkowego i z tego powodu może stanowić potencjalny cel specyficznych terapii przeciwnowotworowych. Należy podkreślić, że zdjęcia mogły być wykonywane już po zaledwie 10-15 minutach od miejscowej aplikacji kontrastu fluorescencyjnego. Naukowcy udowodnili skuteczne różnicowanie tkanek zdrowych i nowotworowych w oparciu o specyficzne barwienie receptora VEGFR-1. Szczególnie istotne okazały się obserwacje znaczących różnic w intensywności fluorescencji pomiędzy tkanką zdrową a zmienioną na brzegach guza, zmniejszając tym samym margines błędu tak istotny przy resekcji chorej tkanki. Powyższe badania prowadzone były na mysim, transgenicznym modelu nowotworu, jednak obiecujące wyniki dadzą z pewnością początek dalszym badaniom diagnostycznym z udziałem ludzi.

Wykorzystywana w badaniach klinicznych technika CLE już w niedalekiej przyszłości może również znaleźć zastosowanie w wizualizacji *in vivo* czynników wzrostu i cząsteczek sygnałowych występujących w nowotworach. W badaniach prowadzonych przez grupę Foersch (FOERSCH i współaut. 2010) na mysich modelach raka żołądkowo-jelitowego, obrazowano obecność czynnika wzrostu śródbłonka naczyniowego (ang. vascular endothelial growth factor, VEGF), pełniącego kluczową rolę w procesie angiogenezy, migracji i proliferacji naczyń krwionośnych, a więc w promocji wzrostu guza. Już po 24 godzinach po iniekcji poliklonalnych przeciwciał skierowanych przeciwko różnym izoformom czynnika VEGF, skoniugowanych z fluoroforem (Alexa Fluor 488), możliwe było wysokorozdzielcze obrazowanie systemu naczyń krwionośnych guzów nowotworowych. Analiza statystyczna wykazała wysoki stopień korelacji pomiędzy obrazami CLE i histologicznymi (FOERSCH i współaut. 2010). Tak optymistyczne dane sugerują, że technika CLE może zostać niedługo swoistą „histologią *in vivo*”, dając nadzieję wielu pacjentom z podejrzeniem nowotworów przewodu pokarmowego na szybką i specyficzną diagnozę.

Nisko zróżnicowany nowotwór surowicy jajnika (ang. high-grade serous ovarian cancer, HGS-OvCa), posiadający zdolność bardzo szybkiego przerzutowania, należy

do jednych z najgorzej rokujących nowotworów występujących u kobiet (KIMA i współaut. 2012). Niewielka zmiana na powierzchni jajnika, mimo że nie ujawnia żadnych symptomów choroby, może już dawać początek licznym mikro-przerzutom w obszarze otrzewnej. Chirurgiczne usunięcie zmian nowotworowych w obrębie jajnika okazuje się często nieefektywne, a dodatkowo pozostałe w organizmie przerzuty wykazują wysoką oporność na chemioterapię (SANTILLIAN i współaut. 2007). Dlatego właśnie tak ważne jest opracowanie technik umożliwiających śledzenie zmian zachodzących już w drobnych guzach, zanim dojdzie do ich przerzutowania. Analizy mające na celu śledzenie rozwoju i składu komórkowego generowanych przerzutów, oparte zostały na badaniach mysiego modelu nowotworu (LEINSTER i współaut. 2012). Zwierzętom wszczepiono w rejon otrzewnej dwa rodzaje komórek nowotworowych: IGROV-1 oraz ID8 ekspresyjny białko zielonej fluorescencji (GFP). Stopień kolonizacji zdrowych tkanek oraz procesu neowaskularyzacji guzów śledzono przez około 10 tygodni, wykorzystując m.in. techniki mikroskopii przeżyciowej i mikroskopii konfokalnej. Naczynia krwionośne wybarwiano pośrednio wstrzykując do tkanki biotynylowaną formę lecytyny otrzymywanej z owoców pomidora. Lecytyna jest jednym z głównych lipidów składowych ścian błon komórkowych, bierze też czynny udział w gospodarce cholesterolem w naczyniach krwionośnych. Już po około 3 tygodniach od transplantacji zidentyfikowano nową sieć tworzących się naczyń krwionośnych w obrębie guzów, która w kolejnych tygodniach szybko się rozrastała, prowadząc do powiększania guzów potomnych (LEINSTER i współaut. 2012). Badacze sprawdzali również skład leukocytarny przerzutów nowotworowych, obrazując syntezę markera białych krwinek - CD45. Wykazano, że już 48 godzin po iniekcji komórek nowotworowych do myszy leukocyty gospodarza wykazywały specyficzną akumulację wokół skupisk nowotworowych, z biegiem czasu stopniowo infiltrując chorą tkankę. Zaobserwowano także zmianę składu komórek układu immunologicznego guza w miarę postępu choroby. W początkowym okresie dominujące są makrofagi F4/80+, natomiast po 8 tygodniach rozwoju w guzie obecne były niemal wyłącznie limfocyty T CD3+ i tylko pojedyncze makrofagi.

Zastosowane metody obrazowania struktury budujących się guzów nowotworowych zostały wykorzystane także do oceny efektywności terapii celowanej, polegającej na wyciszeniu ekspresji genu receptora CXCR4 za pomocą specyficznych siRNA. Receptor ten występuje powszechnie w nowotworach przerzutujących do rejonu otrzewnej i pełni istotną rolę w procesie wzrostu i rozwoju guza. Dzięki takiemu podejściu możliwe było sukcesywne zahamowanie procesu nie tylko

angiogenezy i rozrostu tkanki nowotworowej po terapii siRNA, ale również rekrutacji i infiltracji komórek układu odpornościowego do chorej tkanki (LEINSTER i współaut. 2012).

Wnikliwa ocena wizualna składu komórkowego wykrytego guza, stanu zaawansowania procesu angiogenezy oraz stopnia infiltracji przez leukocyty może być w przyszłości doskonałym elementem diagnostyki na oddziałach onkologicznych.

NOWOTWOROWE KOMÓRKI MACIERZyste

Według wyników najnowszych badań proces przerzutowania nowotworów wydaje się być ściśle związany z teorią istnienia nowotworowych komórek macierzystych (ang. cancer stem cells, CSC). Komórki te wykazują cechy bardzo zbliżone do normalnych komórek macierzystych, obecnych w każdej tkance organizmu, prezentują jednak szereg specyficznych markerów i wykazują podwyższoną zdolność do onkogenezy i migracji (WIECZOREK i NIEWIAROWSKA 2012).

Identyfikacja CSC w tkankach nowotworowych prowadzona jest najczęściej *in vitro* na modelach ludzkich linii komórkowych oraz fragmentach tkanek pobranych od pacjentów, a także na modelach mysich dzięki fluorescencyjnemu znakowaniu specyficznych tkankowo markerów (TIRINO i współaut. 2008). Jak dotąd nie udało się zidentyfikować uniwersalnego białka czy enzymu podlegającego syntezie wyłącznie w CSC, a nieobecnego przy tym w normalnych komórkach macierzystych. Najbardziej popularnymi markerami używanymi do oznaczania puli CSC w obrazach konfokalnych za pomocą przeciwciał są białka z grupy CD, m.in. glikoproteiny CD44 i CD133 oraz enzym dehydrogenaza aldehydowa. Liczne badania na modelach zwierzęcych ksenograftów wskazują, że markery te korelują ze zdolnością inicjowania przerzutów, szybszą migracją komórek oraz aktywacją szlaku EMT w wielu przypadkach chorób nowotworowych (KRISHNAMURTHY i NÖR 2012). Jednoczesna analiza syntezy kilku markerów charakterystycznych dla CSC może być pomocna w ocenie stopnia zróżnicowania guzów i weryfikacji prognozy dla pacjenta, a w przyszłości podjęciu decyzji o terapii celowanej, zwalczającej nie tylko zróżnicowane komórki nowotworowe, ale i samoodnawiające się.

Bardzo ciekawe zastosowanie mikroskopii konfokalnej w diagnostyce nowotworowej zaproponowała grupa Zhao (ZHAO i współaut. 2013). Naukowcy przedstawili panel umożliwiający detekcję komórek nowotworowych krążących w krwi obwodowej pacjenta (ang. circulating tumour cells, CTCs). Zazwyczaj liczba CTC mieści się w zakresie od 1 do 10 komórek na miliard komórek krwi, przez co pula ta jest praktycznie niewykrywalna standardowymi metodami, a analiza cytometryczna jednej próbki może trwać ponad dobę. Eksperymentalny panel składał się z mikrofluidycznego chipu, na który nanoszona była próbka krwi oraz mikroskopu konfokalnego. Pełna krew znakowana była bezpośrednio różnorodnymi przeciwciałami skoniugowanymi z fluoroforami o różnym spectrum emisji, dobieganymi według typu badanego nowotworu. W proponowanym modelu analizowano CTC nowotworu piersi IV stopnia, a znakowanymi białkami były jednocześnie potencjalne markery nowotworowych komórek macierzystych tego typu nowotworu: EpCAM, CD45, CD24 oraz Her2. Badana próbka była następnie „przeciskana” pneumatycznie przez światło chipa, a wartości fluorescencji analizowane przez system detektorów mikroskopu konfokalnego. Wykazano, że technika ta jest wyjątkowo czuła i stosunkowo szybka – analiza 1 mililitra próbki krwi trwa zaledwie około 20 minut (ZHAO i współaut. 2013). Taki automatyczny system może być dostosowywany do różnorodnych typów chorób nowotworowych poprzez zmianę kryteriów detekcji przeciwciał dla określonych markerów i stanowić doskonale uzupełnienie diagnostyki nowotworów złośliwych.

WADY I NIEDOSKONAŁOŚCI

Mimo wielu niewątpliwych zalet diagnostyka oparta na obecnie dostępnych i stosowanych technikach mikroskopii konfokalnej wymaga ciągle dopracowania. W przypadku niektórych typów nowotworów ocena zdjęć pozostaje nadal niejednoznaczna i utrudniona. Przykładowo, odbiciowa mikroskopia konfokalna, stosowana pioniersko w badaniach dermatologicznych *in vivo*, okazała się zupełnie nieskuteczna w przypadku diagnostyki zmian położonych w głębszych partiach skóry, takich jak np. rak kolczystokomórkowy (ULRICH i współaut. 2012). Uzyskane obrazy były nieostre i zamglone, co wiązało się ze znaczącym utrudnieniem prawidłowej diagnozy. Kolejną barierą dla szeroko zakrojonych badań *in vivo* z wykorzystaniem mikroskopii konfokalnej jest konieczność używania barwników fluorescencyjnych, które w wyższych stężeniach okazały się mieć właściwości toksyczne lub mutagenne dla organizmów (MILEWSKI i współaut. 2011). Ponadto, moc laserów do badań w organizmach żywych musi być regulowana szczególnie skrupulatnie i ostrożnie, aby nie wywołać nadmiernego stresu oksydacyjnego i przegrzania komórek (ST. CROIX i współaut. 2005). Niewątpliwie jedną z wad nowocze-

snej mikroskopii konfokalnej są też wysokie koszty zakupu i eksploatacji aparatury. Nie bez znaczenia pozostaje fakt, że obsługa sprzętu wymaga szeregu specjalistycznych szkoleń i doświadczenia w ocenie uzyskiwanych obrazów, szczególnie w przypadku diagnozowania niewielkich zmian nowotworowych o niejednorodnej strukturze komórkowej (ULRICH i współaut. 2012). Obecnie, z powodu powyższych ograniczeń przeważająca większość badań nad procesami onkogenezy wykorzystująca technikę konfokalną prowadzona jest na poziomie *in vitro* lub na modelach zwierzęcych. Diagnostyka konfokalna *in vivo* charakteryzuje się już znacznie większą złożonością i koniecznością zadbania o zachowanie równowagi i zdrowia całego organizmu. Prowadzone próby tego typu mają ciągle jeszcze charakter eksperymentalny i przy obecnym stanie wiedzy nie mogą całkowicie pomijać analizy histopatologicznej, a jedynie ją uzupełniać (MILEWSKI i współaut. 2011). Jednakże ciągły postęp technologiczny jest niewątpliwym motorem dla powszechnego wprowadzenia technik mikroskopii konfokalnej w diagnostyce onkologicznej.

PODSUMOWANIE

Powszechność występowania chorób nowotworowych w cywilizacji XXI w. wymusza coraz nowocześniejsze udoskonalanie metod diagnostycznych oraz dążenie do możliwie jak najmniej inwazyjnego podejścia w trakcie diagnostyki pacjenta. Po okresie wielkich zasług mikroskopii konfokalnej w badaniach podstawowych *in vitro*, wraz z postępem technicznym i miniaturyzacją urządzeń nadchodzi także okres pionierskich prób diagnostyki konfokalnej na poziomie *in vivo*. Do niewątpliwych zalet techniki mikroskopii konfokalnej przy ocenie zmian nowotworowych należy: (i) doskonała rozdzielczość, przydatna m.in. w ocenie marginesów gu-

zów przeznaczonych do resekcji, (ii) czułość, umożliwiającą znakowanie nawet pojedynczych komórek przerzutujących, np. w krwi obwodowej oraz (iii) nieinwazyjność w podejściu *in vivo* – redukująca ryzyko infekcji lub uszkodzenia tkanki.

Choć głównie z uwagi na wysokie koszty sprzętu oraz trudności z interpretacją obrazów niektórych typów nowotworów, technika ta nie jest jeszcze powszechna w ogólnodostępnej diagnostyce nowotworowej, obiecujące wyniki badań wstępnych otwierają drogę do zupełnie nowej ery w wizualizacji i wykrywaniu wczesnych zmian nowotworowych w organizmie człowieka.

ZASTOSOWANIE MIKROSKOPII KONFOKALNEJ W DIAGNOSTYCE CHOROÓB NOWOTWOROWYCH

Streszczenie

Polepszenie warunków bytowych a także rozwoju powszechnej opieki medycznej miały znaczący

wpływ na wzrost średniej długości życia powodując jednocześnie zwiększenie prawdopodobieństwa na-

gromadzenia mutacji onkogennych w komórkach, a także powstanie zmian prowadzących do procesu nowotworowego. Ponadto zaobserwowano, że częstotliwość występowania chorób nowotworowych jest istotnie związana z obecnością szkodliwych substancji kancerogennych, zarówno w otoczeniu, jak i codziennej diecie. Tak więc, choroby o podłożu onkologicznym stały się globalnym problemem dotyczącym wszystkich rozwiniętych społeczeństw.

Powszechność występowania, stopień zróżnicowania, a także skala problemu zmuszają środowiska naukowe do tworzenia coraz bardziej zaawansowanych metod diagnostycznych, które pozwalałyby na dokładną, szybką i możliwie najtańszą weryfikację zmian w tkankach. To głównie od trafności wstępnej diagnostyki medycznej zależy szybkość rozpoczęcia terapii i możliwość uniknięcia etapu przerzutowania guza. Współczesne metody diagnostyczne w onkologii składają się z 3 głównych typów: diagnostyki laboratoryjnej (opartej na biochemicznych testach aktywności specyficznych enzymów i markerów nowotworowych), patomorfologicznej (histopatologicz-

na ocena wycinków tkankowych lub cytologiczna ocena rozmazów) i obrazowej (RTG, USG, rezonans magnetyczny i tomografia komputerowa). Rozwój mikroskopii konfokalnej, techniki, która pozwala na analizę oddziaływania pojedynczych cząsteczek powiązanej z wykorzystaniem najnowocześniejszych kamer CCD i komputerów o ogromnej mocy obliczeniowej stanowi narzędzie o ogromnym potencjale diagnostycznym.

Z powodu wysokiej rozdzielczości obrazów, nieinwazyjnego podejścia do pacjenta oraz szybkości uzyskiwania wyników mikroskopia konfokalna może już wkrótce stać się nieocenionym narzędziem w diagnostyce nowotworów. Z tego względu stanowi poważną konkurencję dla tradycyjnych badań histopatologicznych wymagających precyzyjnego usunięcia tkanki oraz czasochłonnego przygotowania i analizy pozyskanego materiału biologicznego. W tym artykule przedstawimy różne sposoby wykorzystania mikroskopii konfokalnej stosowane w już obecnie w diagnostyce nowotworowej, jak i te, będące na etapie badań na modelach zwierzęcych.

THE CONFOCAL MICROSCOPY IN CANCER DIAGNOSIS

Summary

Life conditions improvement and the development of common medical care had a significant influence on a life expectancy leading simultaneously to a higher probability of oncogenic mutations accumulation in cells and aberrations drawing to cancer. Furthermore, it was observed that the frequency of cancer diseases is considerably related to the harmful carcinogens present in the environment and everyday diet. Thus, diseases with oncological background has become a global problem concerning every developed society. The popularity of incidence, diversity and the scale of the disease compel scientific environment to invent an advanced diagnostic methods that would enable an accurate, quick and possibly cheapest tissue aberration verification. The therapy starting point and the opportunity to dodge the critical metastatic stage of cancer is mainly depending on the accurateness of the preliminary diagnostics. Contemporary tumor diagnostic methods consist of 3 main types: laboratory

diagnostics (based on biochemical testing of specific enzyme and cancer markers activity), pathomorphology (histopathological analysis of tissue biopsies and cytological rating) and visual diagnostics (RTG, USG, magnetic resonance or computer tomography). The development of confocal microscopy, the technique which allows the analysis of single-molecule interactions, together with state of the art CCD cameras and powerful computers represent a tool of great diagnostic potential. Due to high-resolution images, non-invasive patient approach as well as rapidity in obtaining results, confocal microscopy may soon become an invaluable tool in cancer diagnostics. It is a main rival of traditional histopathological screening that requires a deviant tissue removal, precise and time-consuming preparation and analysis. In this article we present various ways of confocal microscopy employment already present in cancer diagnostics as well as survey animal-stage studies utilizing this technique.

LITERATURA

- AL-ARASHI M. Y., SALOMATINA E., YAROSLAVSKY A. N., 2007. *Multimodal Confocal Microscopy For Diagnosing Nonmelanoma Skin Cancers*. *Laser Surg. Med.* 39, 696-705.
- AHLGRIMM-SIESS V., HORN M., KOLLER S., LUDWIG R., GERGER A., HOFMANN-WELLENHOF R., 2009. *Monitoring efficacy of cryotherapy for superficial basal cell carcinomas with in vivo reflectance confocal microscopy: a preliminary study*. *J. Dermatol. Sci.* 53, 60-64.
- BEKELIS K., BAKHORUM S. F., DESAI A., MACKENZIE T., ROBERTS D. W., 2013. *Outcome prediction in intracranial tumor surgery: the National Surgical Quality Improvement Program*. *J. Neurooncol.* 2005-2010.
- BOISSONNAS A., FETLER L., ZEELENBERG I. S., HUGUES S. A., AMIGORENA S. 2007. *In vivo imaging of cytotoxic T cell infiltration and elimination of a solid tumor*. *J Exp. Med.* 204, 345-356.
- BOUVET M., TSUJI K., YANG M., JIANG P., MOOSSA, A. R., HOFFMAN R. M., 2006. *In vivo color-coded imaging of the interaction of colon cancer cells and splenocytes in the formation of liver metastases*. *Cancer Res.* 66, 11293-11297.
- BRANZAN A. L., LANDTHALER M., SZEIMIES R. M., 2007. *In vivo confocal scanning laser microscopy in dermatology*. *Lasers Med. Sci.* 22, 73-82.
- BRETTTHAUER M., KALAGER M., 2013. *Principles, effectiveness and caveats in screening for cancer*. *Brit. J. Surg.* 100, 55-65.
- CAJ W., SHIN D., CHEN K., GHEYSSENS O., CAO Q., WANG S., CHEN X., 2006. *Peptide-labeled near-infrared quantum dots for imaging tumor vasculature in living subjects*. *Nano Lett.* 4, 669-676.

- CHUNG V.Q., DWYER P. J., NEHAL K. S., RAJADHYAKSHA M., MENAKER G. M., CHARLES C., JIANG S. B., 2004. *Use of ex vivo confocal scanning laser microscopy during Mohs surgery for nonmelanoma skin cancers*. *Dermatol. Surg.* 30, 1470-1478.
- EGBLAD M., EWALD A. J., ASKAUTRUD H. A., TRUITT M.L., WELM B. E., BAINBRIDGE E., PEETERS G., KRUMMEL M. F., WERB Z., 2008. *Visualizing stromal cell dynamics in different tumor microenvironments by spinning disk confocal microscopy*. *Dis. Model. Mech.* 1, 155-167.
- FOERSCH S., KIESSLICH R., WALDNER M., DELANEY P., GALLE I., NEURATH M., GOETZ M., 2010. *Molecular imaging of VEGF in gastrointestinal cancer in vivo using confocal laser endomicroscopy*. *Gut* 59, 1046-1055.
- GAO X., CUI Y., LEVENSON R., CHUNG L., NIE S., 2004. *In vivo cancer targeting and imaging with semiconductor quantum dots*. *Nat. Biotechnol.* 8, 969-976.
- GAREAU D. S., LI Y., HUANG B., EASTMAN Z., NEHAL K. S., RAJADHYAKSHA M., 2008. *Confocal mosaicing microscopy in Mohs skin excisions: feasibility of rapid surgical pathology*. *J. Biomed. Opt.* 13, 054001.
- GOETZ M., KIESSLICH R., 2008. *Confocal endomicroscopy: in vivo diagnosis of neoplastic lesions of the gastrointestinal tract*. *Anticancer Res.* 1, 353-360.
- GONZÁLEZ S., 2008. *Clinical applications of reflectance confocal microscopy in the management of cutaneous tumors*. *Actas Dermosifiliogr.* 99, 528-531.
- GONZÁLEZ S., GILABERTE-CALZADA Y., 2008. *In vivo reflectance mode confocal microscopy in clinical dermatology and cosmetology*. *Int. J. Cosmet. Sci.* 30, 1-17.
- HANAHAN D., WEINBERG R., 2000. *The hallmarks of cancer*. *Cell* 1, 57-70.
- HOFMANN-WELLENHOF R., WURM E. M., AHLGRIMM-SIESS V., RICHTIG E., KOLLER S., SMOLLE J., GERGER A., 2009. *Reflectance confocal microscopy-state-of-art and research overview*. *Semin Cutan Med Surg.* 28, 172-179.
- JAKOLA A., MYRMEL K., KLOSTER R., TORP S., LINDAL S. U., 2012. *Comparison of a strategy favoring early surgical resection vs a strategy favoring watchful waiting in low-grade gliomas*. *JAMA* 18, 1881-1888.
- KIESSLICH R., GOETZ M., BURG J., STOLTE M., SIEGEL E., 2005. *Diagnosing Helicobacter pylori in vivo by confocal laser endoscopy*. *Gastroenterology* 128, 2119-2123.
- KIESSLICH R., GOSSNER L., DAHLMANN A., 2006. *In vivo histology of Barrett's oesophagus and associated neoplasias by confocal laser endomicroscopy*. *Clin. Gastroenterol Hepatol.* 8, 979-987.
- KIM M., LEE J., NEHRBASS U., SONGB R., CHOI Y., 2012. *Detection of melanoma using antibody-conjugated quantum dots in a coculture model for high-throughput screening system*. *Analyst* 137, 1440-1446.
- KIMA J., COFFEY B. D., CREIGHTON C., YUA J., HAWKINS D., MATZUKA M., 2012. *High-grade serous ovarian cancer arises from fallopian tube in a mouse model*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 10, 3921-3926.
- KRISHNAMURTHY S., NÖR J., 2012. *Head and Neck Cancer Stem Cells*. *J. Dent. Res.* 4, 334-340.
- LEINSTER D. A., KULBE H., EVERITT G., THOMPSON R., PERRETTI M., GAVINS F.N., COOPER D., GOULD D., ENNIS D. P., LOCKLEY M., MCNEISH I. A., NOURSHARGH S., BALKWILL F. R., 2012. *The peritoneal tumour microenvironment of high-grade serous ovarian cancer*. *J. Pathol.* 227, 136-145.
- LONGO C., CASARI A., PEPE P., MOSCARELLA E., ZALAUDEK I., ARGENZIANO G., PELLACANI G., 2012. *Confocal microscopy insights into the treatment and cellular immune response of basal cell carcinoma to photodynamic therapy*. *Dermatology* 225, 264-270.
- MILEWSKI J., ŻUK K., KIERZKIEWICZ K., RYDZEWSKA G., 2011. *Laserowa endomikroskopia konfokalna - zasada działania, zastosowania, możliwości rozwoju*. *Przegląd Gastroenterolog.* 1, 1-16.
- MOCARSKA A., STAROSLAWSKA E., IWONNA Z. C., BRZOWSKA A., ŁOSICKI M., STASIEWICZ D., BURDAN F., 2012. *Diagnostic imaging of the prostate cancer*. *Pol. Merkur. Lekarski* 33, 357-363.
- NEWBERNE P. M., CONNER M. W., 1986. *Nutrient influences on toxicity and carcinogenicity*. *Fed. Proc.* 45, 149-154.
- NORI S., RIUS-DÍAZ F., CUEVAS J., GOLDGEIER M., JAEN P., TORRES A., GONZÁLEZ S., 2004. *Sensitivity and specificity of reflectance mode confocal microscopy for in vivo diagnosis of basal cell carcinoma: a multicenter study*. *J. Am. Acad. Dermatol.* 51, 923-930.
- PARK S. L., LE MARCHAND L., WILKENS L. R., KOLONEL L. N., HENDERSON B. E., ZHANG Z. F., SETIAWAN V. W., 2012. *Risk factors for malignant melanoma in white and non-white/non-African American populations: the multiethnic cohort*. *Cancer Prev. Res.* 5, 423-434.
- SANTILLIAN A., KIM Y., ZAHURAK M., GARDENER G., GIUNTOLI R., SHIH I. B., 2007. *Differences of chemoresistance assay between invasive micropapillary/low-grade serous ovarian carcinoma and high-grade serous ovarian carcinoma*. *Int. J. Gynecol. Cancer* 3, 601-606.
- SCHIFFHAUER L. M., BOGER J. N., BONFIGLIO T. A., ZAVISLAN J. M., ZULEY M., FOX C. A., 2009. *Confocal microscopy of unfixed breast needle core biopsies: a comparison to fixed and stained sections*. *BMC Cancer* 9, 265.
- ST. CROIX C. M., SHAND S. H., WATKINS S. C., 2005. *Confocal microscopy: comparisons, applications, and problems*. *Biotechniques* 39, 2-5.
- SZCZEBŁOWSKA D., 2007. *Diagnostyka i leczenie guzów neuroendokrynych przewodu pokarmowego w świetle aktualnie obowiązujących standardów*. *Pol. Merk. Lek.* 131, 437-441.
- TAN J., DELANEY P., McLAREN W. J., 2007. *Confocal endomicroscopy: a novel imaging technique for in vivo histology of cervical intraepithelial neoplasia*. *Expert Rev. Med. Devices* 4, 863-871.
- TIRINO V., DESIDERIO V., D'AQUINO R., DE FRANCESCO F., PIROZZI G., GRAZIANO A., GALDERISI U., CAVALLIERE C., DE ROSA A., PAPACCIO G., GIORDANO A., 2008. *Detection and Characterization of CD133+ Cancer Stem Cells in Human Solid Tumors*. *PLoS One* 3, e3469.
- ULRICH M., STOCKFLETH E., ROEWERT-HUBER J., ASTNER S., 2007. *Noninvasive diagnostic tools for non-melanoma skin cancer*. *Br. J. Dermatol.* 157 (Supl. 2), 56-58.
- ULRICH M., LANGE-ASSCHENFELDT S., GONZÁLEZ S., 2012. *In vivo reflectance confocal microscopy for early diagnosis of nonmelanoma skin cancer*. *Actas Dermosifiliogr.* 103, 784-789.
- USSUI V., WALLACE M., 2012. *Imaged-Enhanced Technologies for Colorectal Polyp Detection and Classification*. *Am. J. Gastroenterol.* 107, 551-553.
- VERMA M., 2012. *Epigenetic biomarkers in cancer epidemiology*. *Methods Mol. Biol.* 863, 467-480.
- WANG D., CHEN Y., LEIGH S., HAEBERLE H. C., LIU J., 2012. *Microscopic delineation of medulloblastoma margins in a transgenic mouse model using a topically applied VEGFR-1 Probe*. *Transl. Oncol.* 5, 408-414.
- WIECZOREK K., NIEWIAROWSKA J., 2012. *Nowotworowe komórki macierzyste*. *Postepy Hig. Med. Dosw.* 66, 629-636.

- WIRTH D., SNUDERL M., SHETH S., KWON C., FROSC M., 2012. *Identifying brain neoplasms using dye-enhanced multimodal confocal imaging*. J. Biomed. Opt. 2, 1-8.
- WU X., LIU H., LIU J., HALEY K., TREADWAY J., LARSON J., BRUCHEZ M., 2003. *Immunofluorescent labeling of cancer marker Her2 and other cellular targets with semiconductor quantum dots*. Nat. Biotechnol. 1, 41-46.
- ZHAO M., SCHIRO P., KUO J., KOEHLER K., SABATH D., POPOV V., FENG Q., CHIU D., 2013. *An automated high-throughput counting method for screening circulating tumor cells in peripheral blood*. Anal. Chem. 85, 2465-2471.